

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



DESARROLLO DE UN MODELO MURINO DE FUSARIOSIS SISTÉMICA

Por

JAZMÍN MÁRQUEZ SANTACRUZ

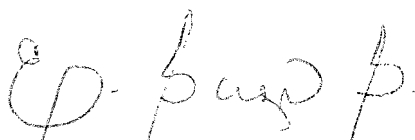
Como requisito para obtener el Grado de MAESTRO EN CIENCIAS
con especialidad en Microbiología Médica

**“DESARROLLO DE UN MODELO MURINO DE FUSARIOSIS
SISTÉMICA”**

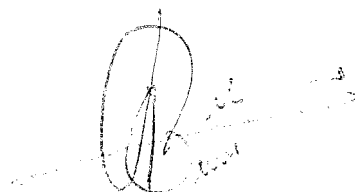
Aprobación de la Tesis:



DRA. GLORIA MARÍA GONZÁLEZ GONZÁLEZ
Director de Tesis



DRA. ELVIRA GARZA GONZÁLEZ
Co-Director de Tesis



DR. LUIS ANGEL CECÉÑAS FALCÓN
Co-Director de Tesis



DR. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

DESARROLLO DE UN MODELO MURINO DE FUSARIOSIS SISTÉMICA

Presentado por Q. F. B. Jazmín Márquez Santacruz

Este trabajo se realizó en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Gloria María González González



Dra. Gloria María González González
Director de Tesis

DEDICATORIA

Para ustedes: papá, mamá, Rubí, Daniel y Miguel,
los quiero.

AGRADECIMIENTOS

Ante todo a Dios por brindarme salud a lo largo todo este tiempo. A mis padres por su apoyo incondicional en todo lo que me propongo realizar, por su paciencia, presencia, confianza y amor que siempre me han brindado. A mis hermanos que bien o mal siempre están ahí, a mi lado, preocupados por mí, así como yo me preocupo por ellos. A Pady por su apoyo, comprensión y cariño, y a los nuevos integrantes de mi familia, Iram y la pequeña Astrid.

A la Dra. Gloria por su confianza y la oportunidad de realizar este trabajo, a la Dra. Elvira y al Dr. Ceceñas por su asesoría y buenos consejos.

También agradezco muchísimo a las personas que me ayudaron ya sea física o emocionalmente durante el desarrollo de este trabajo, a Christian, Merab, Carolina, Rogelio, Magda, Sergio y Gregorio, y a todos mis amigos que de una u otra forma me estuvieron apoyando: Blanca, Reyna, Marisol, Nubia, Sandra, Aziel, Edith, Christian, David, Daniel, Marcela y Sarahí.

A todos muchas gracias!

RESUMEN

Q. F. B. Jazmín Márquez Santacruz

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Médica

Número de páginas: 51

Título del estudio: “DESARROLLO DE UN MODELO MURINO DE FUSARIOSIS SISTÉMICA”

Introducción: La mayoría de las especies del género *Fusarium* son patógenos importantes de plantas, sin embargo algunas especies ocasionan infecciones en humanos, las cuales pueden ser superficiales, localmente invasivas o diseminadas, éstas últimas principalmente en pacientes inmunocomprometidos. La especie de *Fusarium* que con mayor frecuencia se asocia a infecciones en humanos es *F. solani*, aislada en el 50% de los casos. La fusariosis diseminada en pacientes inmunocomprometidos tiene una alta tasa de mortalidad ésta debida en parte a la respuesta refractaria a los antifúngicos utilizados para su tratamiento. Existen modelos animales usados para el estudio del funcionamiento de antifúngicos a nivel *in vivo*, pero sin realizar un estudio profundo del modelo.

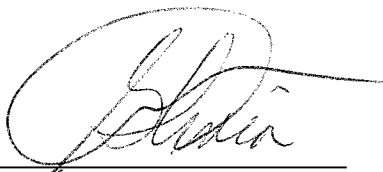
Objetivo: Desarrollar un modelo murino de fusariosis sistémica evaluado por criterios microbiológicos, histológicos y moleculares.

Material y Métodos: Se realizó un estudio de sobrevivencia de cuatro cepas murinas (BALB/c, C57BL, CB6F1 e ICR) las cuales se infectaron con 1×10^7 conidias de *F. solani*/ratón. En base a los resultados obtenidos del estudio de sobrevivencia, se seleccionaron las cepas BALB/c e ICR para realizar el estudio de la carga microbiana. Para lo cual se infectaron ratones de ambas cepas con *F. solani* y se cuantificó el hongo en los tejidos utilizando tres métodos: el microbiológico, mediante la cuantificación de las unidades formadoras de colonias por gramo de tejido; el molecular, mediante la cuantificación del ADN del hongo; y el histológico, mediante la observación microscópica de los tejidos infectados.

Resultados: Las cepas C57BL y CB6F1 presentaron una sobrevivencia del 70 y 90% respectivamente durante los 14 días que estuvieron en observación. Por otro lado, las cepas BALB/c e ICR presentaron una mortalidad del 100% en los días +10 y +11 post-infección respectivamente. La cuantificación microbiológica de *F. solani* en bazo y riñones de ratones BALB/c e ICR infectados fue de alrededor de 1×10^3 UFC/g de tejido. La cuantificación molecular del hongo en los órganos estudiados en ambas cepas murinas fue de un mínimo de 1×10^5 equivalentes de conidias de *F. solani*/g tejido el día +2 post-infección y un máximo 1×10^8 equivalentes de conidias de *F. solani*/g tejido el día +9 post-infección. La semicuantificación histológica del hongo en bazo y riñones de las cepas murinas estudiadas mostró el progreso de la infección por *F. solani* ya que la presencia de estructuras micóticas fue en incremento del día +2 al día +9 post-infección.

Conclusiones: Bajo las condiciones experimentales de concentración de inóculo y esquema de inmunosupresión establecidas en este modelo murino, las cepas BALB/c e ICR fueron susceptibles a la infección por *F. solani*, y las cepas C57BL y CB6F1 fueron resistentes. Los resultados de la evaluación de la progresión de la infección fúngica mediante los procedimientos molecular y microbiológico fueron discrepantes. La evaluación histológica coincidió con los resultados obtenidos de la cuantificación molecular.

DIRECTOR DE TESIS



Dra. Goría Ma. González González

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO	Página
1. Introducción	
1.1. Generalidades del género <i>Fusarium</i>	1
1.1.1. Características microbiológicas	2
1.1.2. Medios de cultivo para el crecimiento de <i>Fusarium</i>	3
1.2. Epidemiología de la fusariosis	5
1.3. Factores de riesgo de la fusariosis	7
1.4. Espectro clínico de la fusariosis	8
1.4.1. Manifestaciones clínicas	8
1.5. Diagnóstico	11
1.6. Pronóstico	13
1.7. Tratamiento	13
1.7.1. Susceptibilidad antifúngica <i>in vitro</i>	14
1.8. Uso de modelos animales para estudio de fusariosis y de eficacia terapéutica	15
1.9. Justificación	18
1.10. Objetivos	19
1.10.1. Objetivo general	
1.10.2. Objetivos específicos	
2. Materiales y métodos	
2.1. Estrategia general	20
2.2. Microorganismo	21
2.3. Preparación del inóculo para los estudios de sobrevivencia y carga microbiana	23
2.4. Estudio de sobrevivencia	24
2.4.1. Cepas murinas	24
2.4.2. Infección	24
2.4.3. Registro de mortalidad	25
2.5. Estudio de carga microbiana	25
2.5.1. Cepas murinas	25
2.5.2. Modelo animal	25
2.5.3. Preparación de las muestras para la cuantificación de la carga microbiana	26
2.5.4. Cuantificación microbiológica	26
2.5.5. Cuantificación molecular	26
2.5.6. Semicuantificación histológica	28
2.5.7. Análisis estadístico	29

3. Resultados	30
4. Discusión	43
5. Conclusiones	47
6. Perspectivas	48
7. Referencias	49

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1	
Escala semicuantitativa para estructuras micóticas en tejido infectado.	28
Tabla 2	
Escala semicuantitativa para el daño tisular en órganos infectados.	29
Tabla 3	
Semicuantificación histológica de <i>F. solani</i> en bazo de ratones BALB/c infectados.	35
Tabla 4	
Semicuantificación histológica de <i>F. solani</i> en riñones de ratones BALB/c infectados.	37
Tabla 5	
Semicuantificación histológica de <i>F. solani</i> en bazo de ratones ICR infectados.	40
Tabla 6	
Semicuantificación histológica de <i>F. solani</i> en riñones de ratones ICR infectados.	42

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1	
Esquema de la estrategia general seguida para el desarrollo del modelo murino de fusariosis sistémica	21
Figura 2	
Estudio de sobrevivencia de las diferentes cepas murinas infectadas con <i>F. solani</i>	30
Figura 3	
Cuantificación microbiológica de <i>F. solani</i> en tejidos de ratones BALB/c	31
Figura 4	
Curva de calibración para la cuantificación de <i>F. solani</i> por qPCR en bazo	32
Figura 5	
Curva de calibración para la cuantificación de <i>F. solani</i> por qPCR en riñón	33
Figura 6	
Cuantificación molecular de <i>F. solani</i> en tejidos de ratones BALB/c	34
Figura 7	
Micrografías de cortes de bazo de ratones BALB/c infectados con <i>F. solani</i>	35
Figura 8	
Micrografías de cortes de riñón de ratones BALB/c infectados con <i>F. solani</i>	36
Figura 9	
Cuantificación microbiológica de <i>F. solani</i> en tejidos de ratones ICR	38
Figura 10	
Cuantificación molecular de <i>F. solani</i> en tejidos de ratones ICR	39
Figura 11	
Micrografías de cortes de bazo de ratones ICR infectados con <i>F. solani</i>	40
Figura 12	
Micrografías de cortes de riñón de ratones ICR infectados con <i>F. solani</i>	41

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del género *Fusarium*

Las especies del género *Fusarium* han sido por muchos años importantes patógenos de plantas en las cuales ocasionan enfermedades como la putrefacción del tallo y granos en el maíz, la marchitez en palmas datileras y hortalizas y la despigmentación de granos de cereales como el trigo y pueden ocasionalmente causar infección en animales. En humanos, algunas especies de *Fusarium* causan un amplio espectro de infecciones, que incluyen infecciones superficiales (como queratitis y onicomicosis), e infecciones localmente invasivas o diseminadas, las cuales ocurren de manera casi exclusiva en pacientes severamente inmunocomprometidos. Además, las especies de *Fusarium* pueden causar enfermedades alérgicas (sinusitis) en individuos inmunocompetentes y micotoxicosis en humanos y animales debido a la ingestión de alimentos contaminados con las toxinas producidas por el hongo [1-2].

El género *Fusarium* está ampliamente distribuido en suelos, aire y en las partes aéreas y subterráneas de plantas así como en restos de ellas y otros sustratos orgánicos. Son comunes en regiones tropicales y templadas pero también se encuentran en áreas desérticas, alpinas y árticas. Su amplia distribución puede ser atribuida a su habilidad

de crecer en un gran rango de sustratos y a sus mecanismos eficientes de dispersión [2-3].

1.1.1 Características microbiológicas

El género *Fusarium* es de crecimiento rápido (tres a cinco días) en medios de cultivo habituales como el agar de Sabouraud y otros sin cicloheximida. En agar papa dextrosa *Fusarium* produce colonias de textura aterciopelada a algodonosa de diversos colores como blanco, violeta, rosa, salmón, rojo, anaranjado, amarillo o gris [4-7].

Microscópicamente, las hifas de *Fusarium* son hialinas, septadas, con un diámetro de 3-8 μm y ramificadas en ángulos agudos o rectos [3]. Las especies de *Fusarium* pueden producir tres tipos de esporulación asexual: macroconidias, microconidias y clamidosporas. Algunas especies producen los tres tipos de esporulación. Las macroconidias son producidas en una estructura especializada denominada esporodoquio el cual da soporte a las monofiálides que las sostienen, las macroconidias además pueden ser producidas en monofiálides o polifiálides en el micelio aéreo. La morfología de las conidias es la característica clave para la identificación del género *Fusarium*. Las macroconidias son pluricelulares (1-5 septos) en forma de hoz o plátano y con una célula basal en forma de pie. Las microconidias son producidas en mono- o polifiálides en el micelio aéreo, nunca en esporodoquio. Éstas difieren de las macroconidias en tamaño y forma. La mayoría de las

microconidias no tienen de septos y son de formas muy variadas (fusiformes, ovales, ovoides, alantoides, napiformes, piriformes), organizadas en cadenas o en racimos. Si las microconidias están presentes: la forma, el número de células y su organización son importantes para la identificación. Las clamidosporas no siempre están presentes, éstas son redondas, de pared rugosa o lisa y se organizan en cúmulos o en cadenas. Cuando se presentan en cadenas, las clamidosporas pueden estar intercaladas o al final del crecimiento hifal [2-3, 5-6].

1.1.2 Medios de cultivo para el crecimiento de *Fusarium*

El agar papa dextrosa (APD) es un medio valioso principalmente para la observación de la morfología macroscópica y la pigmentación de las colonias. El agar papa dextrosa generalmente beneficia el crecimiento micelial pero no la esporulación, los cultivos en dicho agar frecuentemente tardan más de un mes en esporular y las conidias producidas con frecuencia presentan formas atípicas. Por lo tanto, los cultivos en APD no son usados para realizar observaciones microscópicas. Los cultivos que superficialmente son parecidos pueden representar diferentes especies, y los cultivos que se observan diferentes pueden ser la misma especie.

Las mutaciones también se ven favorecidas cuando las especies de *Fusarium* son cultivadas en APD o en medios similares, éstos alteran la descripción de las colonias, los tipos de esporas producidas y la morfología de las macroconidias [5].

En agar hojas de clavel (AHC) se promueve la esporulación sobre el crecimiento micelial. Las conidias y conidióforos se producen en abundancia, su morfología se aproxima a la observada bajo condiciones naturales y las variaciones fenotípicas están reducidas. El valor del AHC como medio de crecimiento para *Fusarium* spp. es el hecho de que es un medio bajo en carbohidratos y que contiene sustancias complejas del tipo que naturalmente encuentra *Fusarium* en el medio ambiente; consecuentemente el hongo crece y esporula de manera similar a lo encontrado en plantas infectadas.

Las hojas del clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) se cosechan de plantas en crecimiento libres de residuos de pesticidas. Las hojas se cortan en piezas de aproximadamente 5 mm² y se secan en un horno a una temperatura de 45-55°C por dos horas. Cuando las hojas ya están secas, éstas deben estar verdes y crujientes. La pérdida de la pigmentación verde indica que la temperatura de secado fue muy alta. Las piezas de hoja se colocan en un recipiente de 5 cm de fondo y 9 cm de diámetro y se esteriliza con 2.5 megarads de radiación gamma proveniente de una fuente de Cobalto 60.

El AHC se prepara colocando varias piezas de hojas estériles en cajas petri a las cuales se les añade agar al 1.5-2% enfriado hasta 45°C. El medio se deja a temperatura ambiente por 3 a 4 días antes de usarse para verificar la ausencia de crecimiento de posibles contaminantes en las piezas de hoja [5].

El medio KCI promueve la formación abundante y de mayor longitud de microconidias en cadena en aquellas especies que las formen. Además las cadenas

son más fáciles de observar ya que hay menos humedad en la superficie del agar y menos gotas de agua en el micelio aéreo. La observación directa de cultivos de 4 a 5 días bajo al microscopio demuestra si las microconidias están organizadas en cadenas o no, y puede mostrar la presencia de mono o polifiálides. El medio KCl se prepara añadiendo 4 a 8 gramos de cloruro de potasio a un litro de agar al 1.5%. [5]. El agar-tierra es útil para estimular la formación rápida de clamidosporas en un gran número de especies de *Fusarium*. Se utiliza una pieza grande de inóculo del cultivo activo para sembrar en una placa con agar-tierra. La formación de clamidosporas ocurre principalmente en la pieza original del inóculo. En este medio de cultivo las clamidosporas pueden formarse en 4 a 6 días de incubación a diferencia de otros medios donde se requieren más de 30 días para su formación [2].

1.2 Epidemiología de la fusariosis

Se han identificado más de 50 especies de *Fusarium*, incluyendo patógenos de plantas y animales, pero muy pocas causan infecciones en humanos. De acuerdo a una revisión de la literatura publicada en el 2007 en la cual se analizaron 259 casos de fusariosis publicados del año 1966 al 2001 (excluyendo casos de queratitis y onicomycosis) y 35 casos adicionales publicados entre el 2001 y el 2005, *Fusarium solani* fue la especie más frecuente (~50% de los casos), seguida por *Fusarium oxysporum* y *Fusarium verticillioides* (~20% de los casos cada una). Otras especies

que con menor frecuencia infectan humanos incluyen: *F. dimerum*, *F. proliferatum*, *F. chlamidosporum*, *F. sacchari*, *F. nygamai*, *F. napiforme*, *F. antophilum*, y *F. vasinfectum*.

Desde la descripción del primer caso de fusariosis diseminada en un niño con leucemia aguda en 1973, los reportes de esta micosis oportunista se han incrementado de forma dramática; de hecho, en muchos centros de cuidados especializados para el cáncer, la fusariosis invasiva ha surgido como la segunda causa de infección invasiva por hongos filamentosos en pacientes profundamente inmunocomprometidos después de la aspergilosis invasiva [3, 8].

La incidencia global de fusariosis es de 5.97 casos por cada 1000 receptores de trasplante de células madre hematopoyéticas. La incidencia difiere de acuerdo al tipo de trasplante alogénico: 4.21–5.0 casos por cada 1000 trasplantados de donador emparentado HLA-compatible, 2.28 por cada 1000 trasplantados de donador no emparentado HLA-compatible, y 20.19 por cada 1000 trasplantados de donador emparentado HLA-incompatible. La incidencia es menor en pacientes con trasplantes autólogos: 1.4 –2.0 casos por cada 1000 pacientes [9].

La principal vía de entrada de *Fusarium* spp. es por vía respiratoria, seguida por la piel a través de heridas previas. Recientemente se ha mostrado que el sistema de agua de hospitales puede ser un reservorio para *Fusarium* spp. El asearse en regaderas parece representar un mecanismo de dispersión de las conidias a través del aire y por tanto la transmisión al hospedero inmunocomprometido [10]. El papel

de la piel como portal de entrada tiene soporte en el desarrollo de infecciones en el sitio de lesiones en piel debidas a traumas, quemaduras u onicomicosis y en el desarrollo de celulitis (normalmente en lesiones en dedos de pies y manos) la cual puede permanecer localizada o conducir a una infección diseminada en pacientes inmunocomprometidos [1]. Con menor frecuencia, los senos paranasales y el tracto gastrointestinal suponen una vía de entrada para la fusariosis [9].

1.3 Factores de riesgo de la fusariosis

Los factores de riesgo dependen del estatus inmunológico del paciente, las personas inmunocomprometidas en alto riesgo de adquirir fusariosis son aquellas con neutropenia profunda (<100 células/mm³) y prolongada (>10 días) y/o con inmunodeficiencia severa de células T. A diferencia de las infecciones en personas competentes, la fusariosis en la población inmunocomprometida es generalmente invasiva y diseminada. Los factores de riesgo para desarrollar una fusariosis diseminada incluyen inmunosupresión severa (principalmente en pacientes con problemas hematológicos), específicamente neutropenia, linfopenia, enfermedad injerto contra huésped, terapia con corticoesteroides o algún otro tratamiento inmunosupresivo [1, 3]. En un estudio de 84 pacientes con fusariosis (38 procedentes de Estados Unidos y 53 de Brasil) de los cuales 5 presentaban anemia aplásica y 79 se diagnosticaron con cáncer hematológico (87% presentaban cáncer activo en el momento en que fueron diagnosticados con fusariosis), la infección

ocurrió con mayor frecuencia en pacientes con leucemia aguda (56%) y la mayoría de los pacientes (83%) presentaban neutropenia al momento del diagnóstico [11].

1.4 Espectro clínico de la fusariosis

Las especies de *Fusarium* causan un amplio espectro de infecciones en humanos, las cuales pueden dividirse en infecciones superficiales, invasivas localizadas y diseminadas, esta última se presenta casi exclusivamente en pacientes severamente inmunocomprometidos, por tanto, las formas clínicas de la fusariosis dependen en gran medida del estado inmunológico del hospedero. Las infecciones más comunes son queratitis y onicomicosis. Con menor frecuencia, la infección puede ocurrir como resultado de daño a la piel, como en el caso de quemaduras y heridas, o por la presencia de cuerpos extraños, como queratitis en usuarios de lentes de contacto. Puede producirse peritonitis en pacientes que reciben diálisis peritoneal ambulatoria continua y fungemia asociada a catéteres. Otras infecciones incluyen neumonía, artritis séptica, sinusitis, tromboflebitis, endoftalmitis y osteomielitis [1, 10].

1.4.1 Manifestaciones clínicas

Las especies del género *Fusarium* pueden ocasionar infecciones superficiales como queratitis, onicomicosis e infección cutánea. Las especies de *Fusarium* son los agentes causales más frecuentes de queratitis fúngica en los Estados Unidos. El

principal factor de predisposición es la presencia de lesiones en la córnea debido a la implantación de materia vegetal o tierra. La presencia de alguna enfermedad de base en la córnea o el uso concomitante de corticoesteroides tópicos, antibióticos y lentes de contacto contaminados parecen incrementar también el riesgo de desarrollar una queratitis por *Fusarium* spp. Las manifestaciones clínicas de esta infección no son específicas, son similares a las presentadas en queratitis debidas a otros agentes etiológicos [2-3, 10].

Fusarium spp. puede invadir las uñas de los pies y manos luego de contaminación con tierra. Las presentaciones clínicas más comunes incluyen onicomycosis subungueal proximal con y sin paroniquia y onicomycosis superficial blanca. Aunque regularmente la onicomycosis causada por *Fusarium* spp. se presenta en forma localizada, esta podría representar también la vía de entrada para desarrollar una infección diseminada en pacientes inmunocomprometidos [2-3].

La implicación de la piel en la fusariosis puede representar el sitio primario de la infección, usualmente como una celulitis en los dedos de los pies o como la manifestación de una infección metastásica en pacientes con fusariosis diseminada. La presencia de lesiones en piel se observó en 181 pacientes (70%) de 259 casos publicados de fusariosis (232 inmunosuprimidos y 27 inmunocompetentes) y fue más común en pacientes inmunocomprometidos (72% vs. 52%) en quienes las lesiones fueron diseminadas, de rápida progresión y en diversos estados de evolución. La piel fue la única fuente de diagnóstico para la

mayoría de los pacientes inmunocompetentes e inmunosuprimidos [12]. En lo que respecta a los pacientes inmunocompetentes, las lesiones generalmente son localizadas y ocurren después de traumatismos en la piel u onicomycosis preexistente. En pacientes inmunosuprimidos las lesiones también pueden ser localizadas, generalmente como resultado de daño en la piel causado por traumatismo, o puede conducir a una infección diseminada. Los pacientes con enfermedad diseminada presentan típicamente múltiples lesiones eritematosas papulares o nodulares, las cuales son dolorosas, con frecuencia desarrollan necrosis central dando a las lesiones una apariencia parecida al ectima gangrenoso. Las lesiones en piel debidas a *Fusarium* spp. pueden presentarse en casi cualquier sitio del cuerpo, con predominio en las extremidades [1, 10].

Con menor frecuencia, *Fusarium* spp. puede además causar infecciones invasivas localizadas como endoftalmítis, osteomielítis, artritis, otitis, sinusitis, peritonitis, endocarditis y abscesos en cerebro. En pacientes inmunocompetentes *Fusarium* spp. puede causar sinusitis alérgica o sinusitis crónica invasiva o no invasiva, por el contrario, en pacientes inmunosuprimidos la sinusitis siempre es invasiva. Las manifestaciones clínicas de una sinusitis por *Fusarium* spp. son indistinguibles de las producidas por *Aspergillus* spp. las cuales se caracterizan por obstrucción y secreción nasal. La necrosis de la mucosa es característica y se presenta como consecuencia de la naturaleza angioinvasiva de estas micosis [1, 3, 10].

La infección diseminada es la forma clínica más común de fusariosis en pacientes inmunocomprometidos, se reportó en el 79% de 84 pacientes con enfermedades hematológicas (83% presentaban neutropenia y 33 pacientes se habían sometido a trasplante de células madre hematopoyéticas (TCMH)) [11], en el 75% de 61 pacientes con TCMH (54 trasplantes alogénicos y 7 autólogos) [9], y en el 64% de los 294 casos publicados [10]. Los pacientes con infección diseminada usualmente presentan fiebre persistente y respuesta refractaria a los agentes antifúngicos. Otras características de esta infección incluyen sinusitis y/o infección rinocerebral, celulitis en el sitio de lesión de la piel, endoftalmítis, lesiones dolorosas en piel, neumonía, miositis e infecciones en el sistema nervioso central. Casi cualquier órgano puede ser afectado, pero por lo general los más afectados son la piel (70-90%), seguido de los pulmones y senos paranasales (70-80%) [3]. Las características clínicas de los pacientes con fusariosis diseminada son similares a las de la aspergilosis diseminada. Sin embargo, a diferencia de ésta última, las infecciones por *Fusarium* spp. están asociadas con una alta incidencia de lesiones en piel y cultivos de sangre positivos [1, 3, 10].

1.5 Diagnóstico

El diagnóstico de fusariosis depende de la forma clínica de la enfermedad. El cuadro clínico no es de utilidad para el diagnóstico de queratitis, ya que las manifestaciones clínicas son similares a pesar de la etiología (bacteria u hongo). Usualmente se

requiere el cultivo de raspado corneal o la toma de biopsia de tejido para el diagnóstico definitivo.

En pacientes con inmunosupresión severa, se debe sospechar de fusariosis diseminada cuando se reporta fungemia, cuando presenta celulitis en los dedos de pies o manos, o si hay lesiones cutáneas o subcutáneas. La piel es una fuente importante para el diagnóstico. En un reporte, las lesiones en piel fueron la única fuente para el diagnóstico de la infección por *Fusarium* en el 55% de 181 pacientes incluyendo 148 pacientes con lesiones de piel diseminadas, de los cuales 78 presentaron hemocultivo negativo y la piel fue la única fuente de material para el diagnóstico de estos casos excepto en dos [12]. El examen histopatológico de las lesiones de piel muestra hifas hialinas y septadas, ramificadas en ángulos agudos las cuales invaden la piel y se extienden dentro de los vasos sanguíneos, con trombosis y necrosis en aquellos pacientes con lesiones metastásicas. En contraste con la aspergilosis diseminada, la fusariosis diseminada puede ser diagnosticada mediante hemocultivos en el 40% de los pacientes. El índice de hemocultivos positivos se incrementa a 60% en presencia de lesiones diseminadas en piel. El diagnóstico definitivo de fusariosis requiere del aislamiento de *Fusarium* spp. a partir de los especímenes clínicos (sangre, piel, senos paranasales, pulmón, etc.) [3].

1.6 Pronóstico

La fusariosis diseminada es una enfermedad que pone en riesgo la vida, cuyo pronóstico está influenciado por el estado inmunológico del paciente. La mortalidad global de las infecciones por *Fusarium* en pacientes inmunocomprometidos varía desde un 50 hasta un 80% [3]. En un estudio retrospectivo que incluyó 84 pacientes con fusariosis (35% con leucemia mieloide aguda, 21% con leucemia linfocítica aguda, 15% con leucemia mieloide crónica, 8% con síndrome mielodisplásico, entre otras), se realizó un análisis multivariado donde los factores asociados a baja supervivencia fueron neutropenia persistente y la terapia con corticosteroides. La supervivencia global de pacientes con ambos factores fue de 0%, comparado con un 67% en pacientes que no presentaban ninguno de éstos factores, 30% para aquellos en terapia con corticosteroides (pero con conteo adecuado de neutrófilos), y 4% para pacientes en quienes el único factor de pronóstico negativo fue neutropenia persistente [11].

1.7 Tratamiento

La terapia oportuna en el caso de una infección localizada es crítica para prevenir la progresión a una infección diseminada, la terapia incluye la remoción quirúrgica del tejido infectado y probablemente quimioterapia con antifúngicos sistémicos.

La estrategia para el tratamiento óptimo de los pacientes que presentan una infección severa por *Fusarium* spp. aún no está clara debido a la falta de pruebas

controladas y a que la recuperación está influenciada en gran medida por el estado inmune del paciente. En un análisis retrospectivo de 84 pacientes con enfermedades hematológicas y fusariosis invasiva, el tratamiento consistió de anfotericina B (69 pacientes) o anfotericina B en formulación lipídica (13 pacientes), 2 pacientes no recibieron tratamiento. El 32% de los pacientes respondieron al tratamiento, pero solo el 21% sobrevivió 90 días después del diagnóstico. La tasa de respuesta a la formulación lipídica de anfotericina B fue superior a aquella de anfotericina B no lipídica (46% vs. 32%, respectivamente), pero la diferencia no fue estadísticamente significativa [11]. También se ha utilizado posaconazol en el tratamiento de la fusariosis, 24 pacientes (18 intolerantes o refractarios a tratamientos previos) recibieron este antifúngico y el 24% de ellos respondieron al tratamiento [10]. En pacientes con neutropenia severa, el tratamiento con granulocitos o con factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos también puede tomarse en cuenta [1, 3].

1.7.1 Susceptibilidad antifúngica *in vitro*

El perfil típico de susceptibilidad *in vitro* a antifúngicos para *Fusarium* spp. es aquel en el que se observa resistencia relativa a la mayoría de los agentes [13-15]. Sin embargo, diferentes especies tienen patrones distintos de susceptibilidad. *Fusarium solani* y *Fusarium verticillioides* generalmente son resistentes a los azoles y exhiben altas concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) frente a anfotericina B

comparadas con otras especies de *Fusarium*. Por el contrario, *Fusarium oxysporum* puede ser susceptible al voriconazol y posaconazol. La relevancia de éstos datos *in vitro* no está clara, ya que no hay suficientes datos que documenten una correlación entre las CMIIs y la respuesta clínica [1].

1.8 Uso de modelos animales para estudio de fusariosis y de eficacia terapéutica

El único modelo animal de fusariosis estudiado a profundidad fue el realizado por Legrand y colaboradores [16], quienes desarrollaron un modelo murino de fusariosis sistémica en el cual se estudió la supervivencia de ratones CF₁, normales y neutropénicos. Utilizaron tres inóculos distintos (5×10^5 , 1×10^6 y 5×10^6 conidias/ratón) de *F. solani* y observaron que la mortalidad correlacionó con la dosis del inóculo administrado, ya que la mortalidad fue mayor en el grupo de ratones infectados con el inóculo de mayor concentración que en aquellos infectados con los de menor concentración, también observaron que a cualquiera de los inóculos utilizados la sobrevivencia fue menor en los ratones inmunosuprimidos que en los inmunocompetentes. Además del estudio de sobrevivencia, realizaron una comparación de la carga microbiana determinada en unidades formadoras de colonias (UFCs) del hongo en diferentes órganos de ratones inmunosuprimidos e inmunocompetentes y encontraron que la carga fúngica fue mayor en el grupo de ratones inmunosuprimidos que en los ratones normales.

La cuantificación de la carga fúngica en órganos de animales infectados se ha realizado tradicionalmente mediante la siembra de los tejidos homogenizados en placas de agar y posteriormente la cuenta de las unidades formadoras de colonias. Este método fue desarrollado originalmente para organismos unicelulares, donde una unidad formadora de colonia proviene de una célula. Sin embargo, para hongos filamentosos esta metodología no refleja de forma precisa el número real de células en los tejidos, ya que debido precisamente a la naturaleza filamentosa de estos organismos, una masa fúngica grande, formada por ejemplo, por 10 células, dará lugar a una colonia, de la misma forma que lo hace un organismo unicelular. En el 2001, Bowman y colaboradores desarrollaron un modelo murino de aspergilosis diseminada en donde realizaron un estudio comparativo de la cuantificación de la carga microbiana por UFCs y por PCR cuantitativa de *Aspergillus fumigatus*. Sus resultados demostraron que la PCR en tiempo real puede ser utilizada para monitorear la progresión de una infección fúngica en un modelo murino, específicamente cuando se trata de hongos filamentosos; en el caso de *A. fumigatus*, la determinación de UFCs proporcionó un conocimiento limitado de la progresión de la enfermedad y por lo tanto tiene menor utilidad como ensayo para evaluar la eficacia terapéutica de nuevos antifúngicos [17].

Con el propósito de desarrollar terapias más efectivas para el tratamiento de la fusariosis sistémica, existen estudios donde los modelos animales se han usado para probar el funcionamiento de antifúngicos a nivel *in vivo*, pero sin realizar un estudio

profundo del modelo [18-24]. Existen estudios que demuestran que la susceptibilidad a una infección fúngica en particular varía dependiendo de la vía de inoculación [25] y la cepa de ratones utilizada [25-28], por lo tanto es importante el estudio del modelo animal previo a utilizarlo para la realización de pruebas de eficacia terapéutica.

1.9 Justificación

Las infecciones causadas por especies de *Fusarium* se han incrementado en las últimas décadas, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos en los cuales causan infección diseminada, con una alta tasa de mortalidad debida en parte a la respuesta refractaria a los antifúngicos utilizados para su tratamiento.

En la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas es indispensable contar con un modelo animal evaluado por parámetros que reflejen con mayor exactitud la evolución de la infección.

1.10 Objetivos

1.10.1 Objetivo general

Desarrollar un modelo murino de fusariosis sistémica evaluado por criterios microbiológicos, histológicos y moleculares.

1.10.2 Objetivos específicos

1.10.2.1 Evaluar la sobrevivencia de ratones BALB/c, C57BL, CB6F1 e ICR infectados con 1×10^7 conidias de *F. solani*.

1.10.2.2 Evaluar la carga microbiana en las cepas de ratones seleccionadas infectadas con *F. solani* mediante procedimientos microbiológicos, histológicos y moleculares.

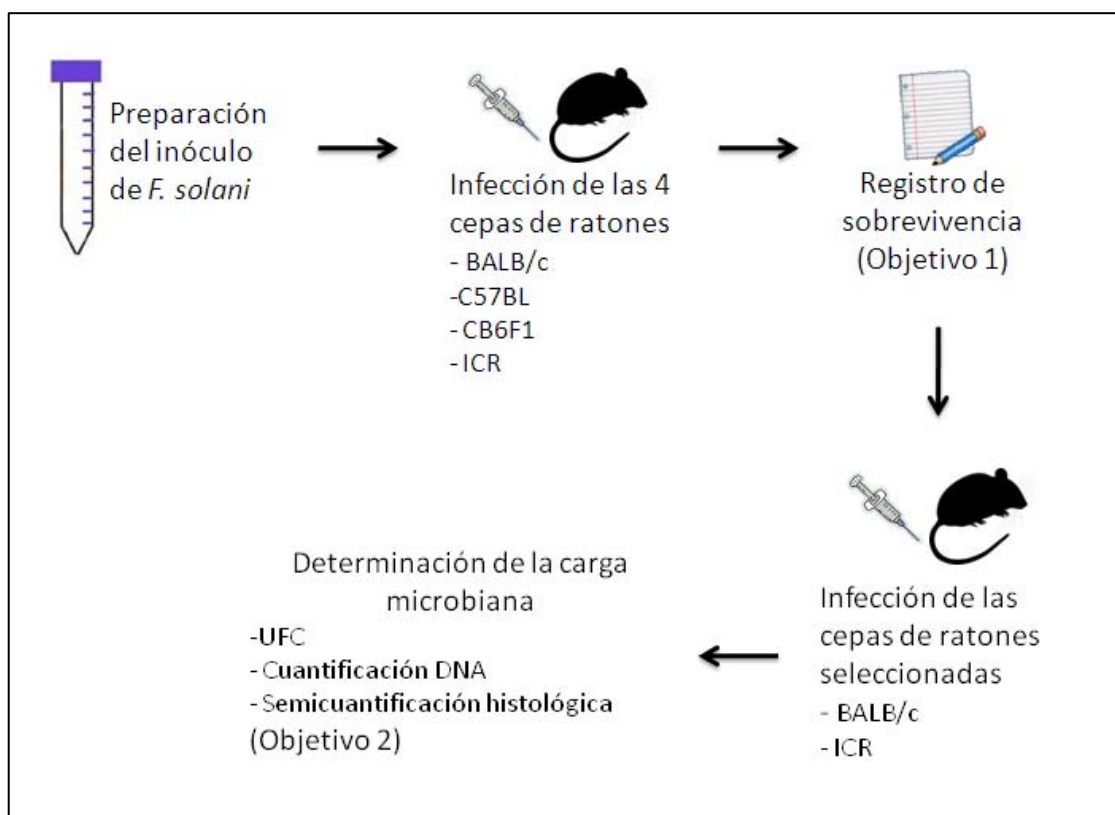
CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Estrategia general

En la figura 1 se muestra la estrategia general que seguimos para cumplir con los objetivos específicos que se plantearon. En primera instancia se preparó el inóculo de *F. solani*, el cual fue utilizado para infectar cada una de las cepas de ratones estudiadas, posteriormente se llevó el registro de la sobrevivencia de cada una de ellas. En base a los resultados obtenidos del estudio de sobrevivencia, se seleccionaron las cepas BALB/c e ICR para realizar el estudio de la carga microbiana. Para lo cual se infectaron ratones de ambas cepas con *F. solani* y se cuantificó el hongo en los tejidos utilizando tres métodos: el microbiológico, mediante la cuantificación de las unidades formadoras de colonias por gramo de tejido; el molecular, mediante la cuantificación del ADN del hongo; y el histológico, mediante la observación microscópica de los tejidos infectados.

Figura 1. Estrategia general seguida para el desarrollo del modelo murino de fusariosis sistémica.



2.2. Microorganismo

El laboratorio de Micología del departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina UANL tenía 11 aislamientos clínicos de *Fusarium solani*. La identificación fenotípica se realizó por medio de las características coloniales y microscópicas.

La confirmación de la identificación fenotípica se llevó a cabo por métodos moleculares mediante PCR de punto final. Para ello se extrajo ADN genómico mediante el método de lisis enzimática y CTAB, para lo cual se cultivó cada aislamiento de *F. solani* en 500 µl de caldo papa dextrosa por 5 a 7 días a 30 °C.

Posteriormente se procedió a eliminar el medio de cultivo para trabajar únicamente con la masa fúngica, a la cual se le agregaron 200 µl de solución de lisis (Tris-HCl 20 mM (pH =8), EDTA 2 mM, Tritón 1.2 %, lisozima 2 mg/ml) y se incubó 2 horas a 37 °C. Después se agregaron 390 µl de TE 1X con SDS al 1% y 4 µl de proteinasa K y se incubó 1 hora a 55 °C. Se añadieron 100 µl de NaCl 5 M y 80 µl de CTAB/NaCl y se incubó por 10 minutos a 65 °C. Posteriormente se realizaron dos extracciones con SEVAG (cloroformo-alcohol isoamílico 24:1) y fenol saturado, se separó la fase acuosa y se precipitó el ADN agregando 0.6 volumen de alcohol isopropílico y 10 % del volumen total de acetato de sodio 3 M (pH 5.4±2) y se colocó a -20 °C por 15 minutos. Se centrifugó 8 minutos a 14 000 rpm y se lavó dos veces la pastilla de ADN con etanol al 70 %, se secó a temperatura ambiente y se disolvió en TE 1X. Las muestras de ADN obtenidas se almacenaron a -20 °C hasta su uso [29-30].

Se estandarizó la PCR de punto final utilizando los primers reportados en el 2000 por Jaeger y colaboradores [31] (Fusofor, 5'-CCAATGCCCTCCGGGGCTAAC-3' y Fusorev, 5'-GCATAGGCCTGCCTGGCG-3'), los cuales amplifican de manera específica un fragmento del gen 18S del ARNr de *F. solani* de aproximadamente 565 pb. La mezcla de reacción de un volumen total de 20 µl consistió de dNTPs 1mM, MgCl₂ 2.5 mM, 5 pmol de cada primer, 1 U Taq polimerasa y 100 µg de ADN, con los siguientes ciclos de temperaturas: una desnaturalización inicial de 94 °C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 45

segundos, alineamiento a 50 °C por 45 segundos y extensión a 72 °C por 45 segundos y una extensión final a 72 °C por 5 minutos. Los productos obtenidos se analizaron en un gel de agarosa al 1.5 % después de la electroforesis. Se obtuvo amplificación del gen 18 S del tamaño esperado para los 11 aislamientos probados. De esta manera se confirmó la identificación de *F. solani*.

Para realizar todos los experimentos se eligió la cepa 2002-30 de *F. solani* debido a la extensa esporulación asexual del aislamiento. La cepa fue aislada de un paciente con queratitis oftálmica.

2.3. Preparación del inóculo para los estudios de sobrevivencia y carga microbiana

Se sembraron placas de agar papa dextrosa con la cepa 2002-30 de *F. solani*, se incubaron a 30 °C durante 7 días. Posteriormente a cada placa se le añadieron 3 ml de solución salina estéril, se rasparon suavemente las colonias con un aplicador estéril con el objeto de remover las conidias de los fragmentos hifales y se recolectó la suspensión de conidias y pequeños fragmentos hifales en tubos cónicos de 50 ml. Se centrifugó la suspensión a 3000 rpm, se decantaron los tubos y el precipitado fue lavado 2 veces con 10 ml de solución salina. Finalmente a todos los precipitados se les añadió 1 ml de solución salina se agitaron en vórtex y se unieron en un único tubo cónico. Se centrifugó, se decantó y el precipitado se suspendió en 1 ml de solución salina. Se tomó 0.1 ml de la suspensión de conidias y se prepararon una serie de diluciones 1:10. Se cuantificaron las conidias

en un hemocitómetro y se ajustaron a una concentración de 5×10^7 UFC/ml. La confirmación de la viabilidad de estos inóculos se realizó mediante siembra en placas petri con agar papa dextrosa. Las colonias se contaron a las 48 horas de incubación a 30 °C.

2.4. Estudio de sobrevivencia

2.4.1. Cepas murinas

Se utilizaron ratones BALB/cAnNHsd, C57BL/6NHsd e ICR machos y CB6F1 hembras de 4 a 6 semanas de edad y con 25 a 30 g de peso. Se hicieron grupos de 10 ratones para cada cepa. Se colocaron 5 ratones por jaula con suficiente agua y alimento durante el experimento.

2.4.2. Infección

Para establecer la infección fúngica los ratones recibieron dos dosis de ciclofosfamida de 200 mg/kg vía intraperitoneal, una administrada 48 horas antes (d-2) de la infección endovenosa con 1×10^7 conidias de *F. solani* por ratón y la segunda aplicación 24 horas después (d+1) de la infección.

2.4.3. Registro de mortalidad

Los animales muertos fueron registrados a lo largo de 14 días post-infección.

Los ratones moribundos fueron sacrificados y sus muertes se registraron como si hubiera sucedido al día siguiente.

2.5. Estudio de carga microbiana

2.5.1. Cepas murinas

Se utilizaron 60 ratones de ambas cepas, BALB/c e ICR, machos de 4 semanas de edad y con 25 a 30 g de peso. Se colocaron 5 ratones por jaula con suficiente agua y alimento durante el experimento.

2.5.2. Modelo animal

Los ratones de ambas cepas fueron infectados con 1×10^7 UFC de *F. solani*/ratón administrados endovenosamente. El esquema de inmunosupresión consistió de 200 mg/kg de ciclofosfamida aplicada los días -2 y +1 relativos al día de la infección (d0). Los días +2, +5, +7 y +9 posteriores al día de la infección se sacrificaron por dislocación cervical, 15 ratones cada día y se extrajeron los riñones y el bazo de forma aséptica. Diez de los ratones sacrificados por día fueron utilizados para cuantificar al hongo mediante los procedimientos microbiológico y molecular. Los 5 ratones restantes

sacrificados por día experimental se utilizaron para la observación histológica de los órganos extraídos.

2.5.3. Preparación de las muestras para la cuantificación de la carga microbiana

Se pesó cada órgano, se colocó en un tubo estéril, se agregaron 4 ml de solución salina por gramo de tejido y se homogenizó. El tejido homogenizado se utilizó de manera inmediata para la cuantificación microbiológica y para la cuantificación molecular se almacenó a -20 °C hasta su evaluación.

2.5.4. Cuantificación microbiológica

Se utilizó el método de dilución seriada y cuenta en placa, para ello se tomó 0.1 ml de cada órgano previamente homogenizado y se prepararon una serie de diluciones 1:10 en solución salina, se tomó 0.1 ml de cada dilución y se sembró en placas petri con agar papa dextrosa. Las colonias se contaron a las 48 horas de incubación a 30 °C.

2.5.5. Cuantificación molecular

Para la extracción de ADN se tomó 0.5 mL de cada órgano homogenizado y se realizó la extracción por el método de lisis enzimática y CTAB descrito previamente [29-30].

Se estandarizó una PCR en tiempo real utilizando un set de primers y sonda diseñados en el software Beacon Designer 4.0 (Primers FsF, 5'-GCCTATGCTCGAATACATTAGC-3' y FsR, 5'-CCCCGACTGTCCCTATTAATC-3' y sonda 5'-FAM-ACGGCGGTCTAGAAACCAACAAA-BHQ-3') para amplificar un fragmento de 100 pb del gen 18S del ARNr de *F. solani*. La mezcla de reacción de un volumen total de 25 µl consistió de dNTPs 0.8 mM, MgCl₂ 3 mM, 5 pmol de cada primer, 3.75 pmol de la sonda, 1 U Taq polimerasa y 1 µl de ADN, con los siguientes ciclos de temperaturas: una desnaturalización inicial de 94 °C por 2 minutos, seguido de 50 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos y alineamiento y extensión a 62 °C por 30 segundos. Se obtuvo amplificación del gen 18S del tamaño esperado. Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo SmartCycler (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA).

Se construyó para cada órgano una curva de calibración de al menos cuatro puntos, para ello se utilizó tejido de riñón y bazo sin infectar a los cuales se les agregó 2×10^7 conidias de *F. solani*, se extrajo el ADN por el método de lisis enzimática y CTAB descrito anteriormente, se realizaron diluciones 1:10 y se procesaron en el equipo SmartCycler en el cual se construyeron las curvas. Para la cuantificación de las muestras se prepararon reacciones con 1 µl de ADN de cada muestra y se procesaron en el equipo SmartCycler para obtener el valor de Ct el cual se utilizó para interpolarlo en la curva de calibración correspondiente.

2.5.6. Semicuantificación histológica

Los órganos extraídos fueron embebidos en parafina y se realizaron cortes de 4 micrómetros de grosor. A los cortes de cada tejido se les practicaron las coloraciones de HyE, PAS y metenamina de plata de Grocott. Se observaron los cortes en búsqueda de invasión micótica y daño tisular, para lo cual se utilizaron dos escalas semicuantitativas, una para las estructuras micóticas desarrollada por el Dr. Luis Ángel Ceceñas y otra para el daño tisular [32] (Tablas 1 y 2).

Tabla 1. Escala semicuantitativa para estructuras micóticas en tejido.

Estructuras micóticas (EM)	
0	Ausencia de hifas
1	1 a 5 hifas en el tejido
2	> 5 hifas pero no en todos los campos
3	Hifas abundantes en todos los campos

Tabla 2. Escala semicuantitativa para el daño tisular en órganos.

Daño tisular (DT)	
0	Sin daño tisular
1	1-25% daño tisular
2	26-50% daño tisular
3	>50% daño tisular

2.5.7. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa GraphPad Prism version 4.03 for Windows, GraphPad Software Inc.

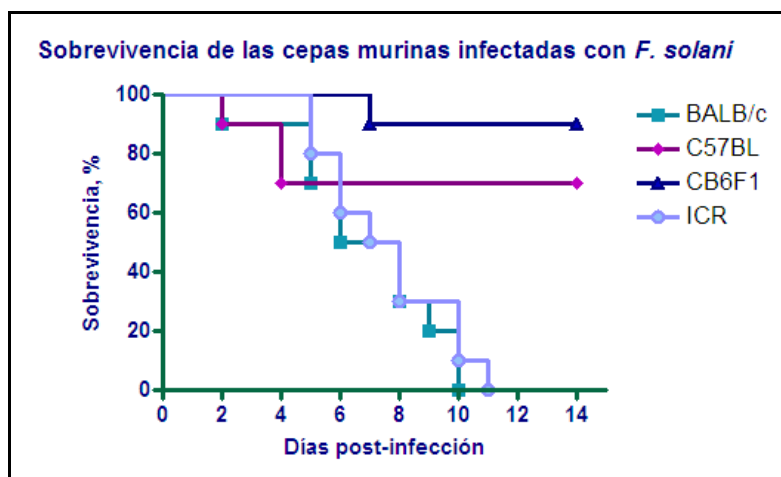
CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1. Estudio de sobrevivencia

En la figura 2 se muestran los resultados de la sobrevivencia de cada una de las cepas murinas infectadas con 1×10^7 conidias de *F. solani*/ratón. Las cepas C57BL y CB6F1 presentaron una sobrevivencia del 70 y 90% respectivamente durante los 14 días que estuvieron en observación. Por otro lado, las cepas BALB/c e ICR presentaron una mortalidad del 100% en los días +10 y +11 post-infección respectivamente, razón por la que el resto de los experimentos se hicieron en estas dos cepas.

Figura 2. Estudio de sobrevivencia de las diferentes cepas murinas infectadas con 1×10^7 conidias de *F. solani*.

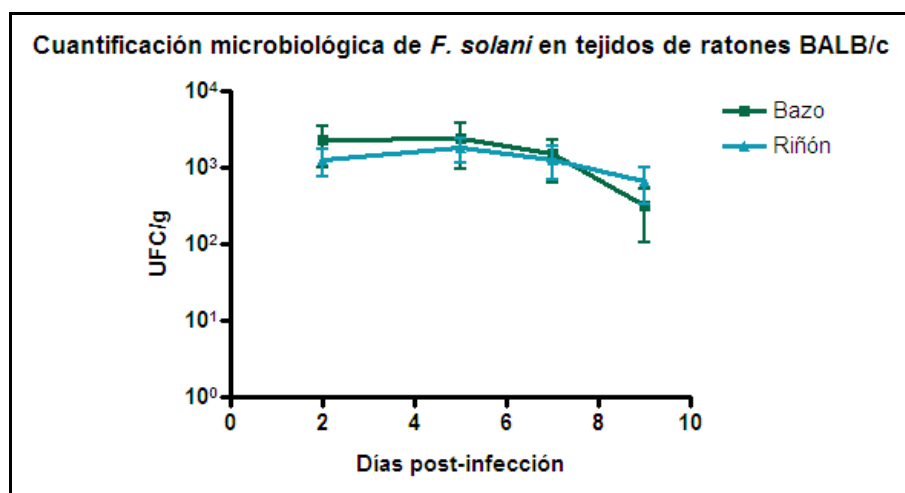


3.2. Estudio de carga microbiana en ratones BALB/c

3.2.1. Cuantificación microbiológica de *F. solani*

En la figura 3 se muestran los resultados de la cuantificación del hongo en bazo y riñón de ratones BALB/c infectados con 1×10^7 conidias de *F. solani*/ratón, en ambos órganos la cantidad del hongo se mantiene aproximadamente entre 500-1500 UFC/gramo de tejido durante los nueve días posteriores a la infección.

Figura 3. Cuantificación microbiológica de *F. solani* en tejidos de ratones BALB/c.



3.2.2. Cuantificación molecular de *F. solani*

Se construyeron dos curvas de calibración agregando una cantidad conocida de conidias de *F. solani* a tejido sin infectar, una para la cuantificación del hongo en bazo y otra para riñón, ambas curvas se muestran en las figuras 4 y 5. En ellas se graficó en el eje de las abscisas el número de ciclos (Ct) y en el

eje de las ordenadas el logaritmo de la concentración de conidias de *F. solani*/gramo de tejido.

Figura 4. Curva de calibración para la cuantificación de *F. solani* por qPCR en bazo.

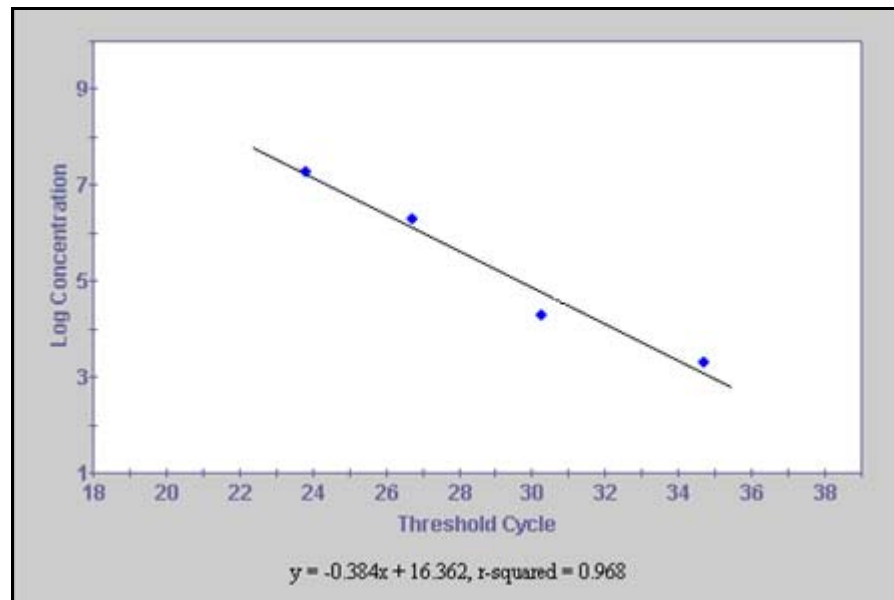
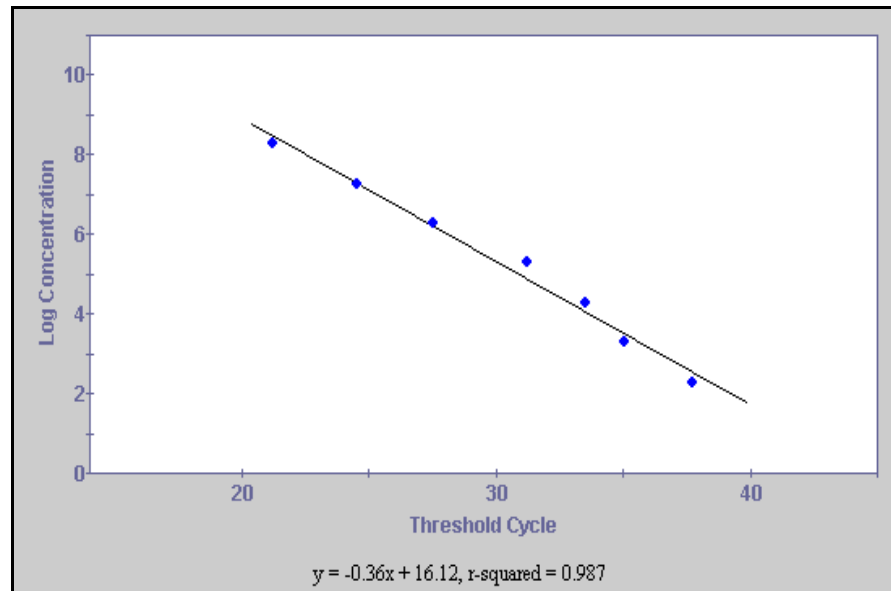
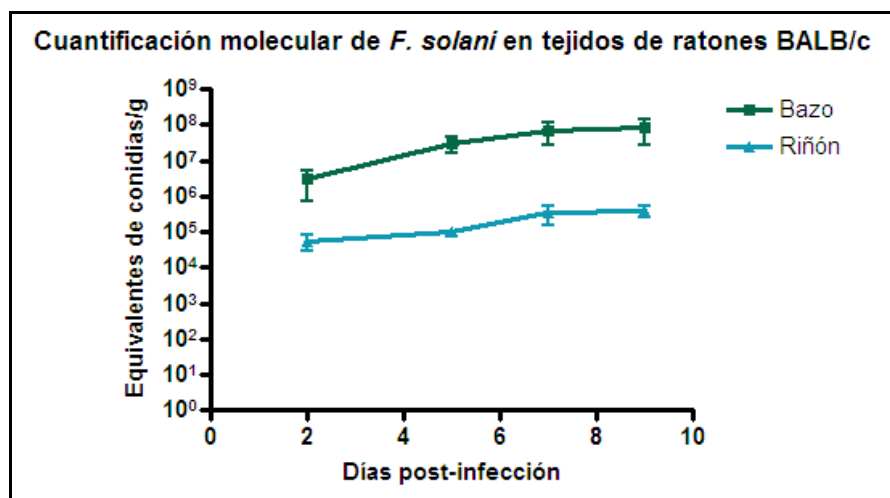


Figura 5. Curva de calibración para la cuantificación de *F. solani* por qPCR en riñón.



En la figura 6 se muestran los resultados de la cuantificación del hongo por el método molecular, se observa que la cantidad de hongo en ambos órganos va en incremento conforme pasan los días, en el caso del bazo, se cuantificó mayor cantidad del hongo que en riñón, en el cual se alcanzó un máximo de aproximadamente 1×10^5 equivalentes de conidias/gramo a diferencia del máximo alcanzado en bazo que fue de aproximadamente 5×10^7 equivalentes de conidias/gramo el día +9 post-infección.

Figura 6. Cuantificación molecular de *F. solani* en tejidos de ratones BALB/c.



3.2.3. Semicuantificación histológica de *F. solani* en bazo

En la figura 7 se muestran micrografías de cortes de bazo representativas de cada día experimental (días +2, +5, +7 y +9 post-infección) en las cuales se observa el progreso de la infección por *F. solani* en bazo de ratones BALB/c.

En la tabla 3 se muestran los resultados de la semicuantificación del hongo en bazo de los ratones BALB/c infectados.

Figura 7. Micrografías de cortes de bazo de ratones BALB/c infectados con *F. solani*.

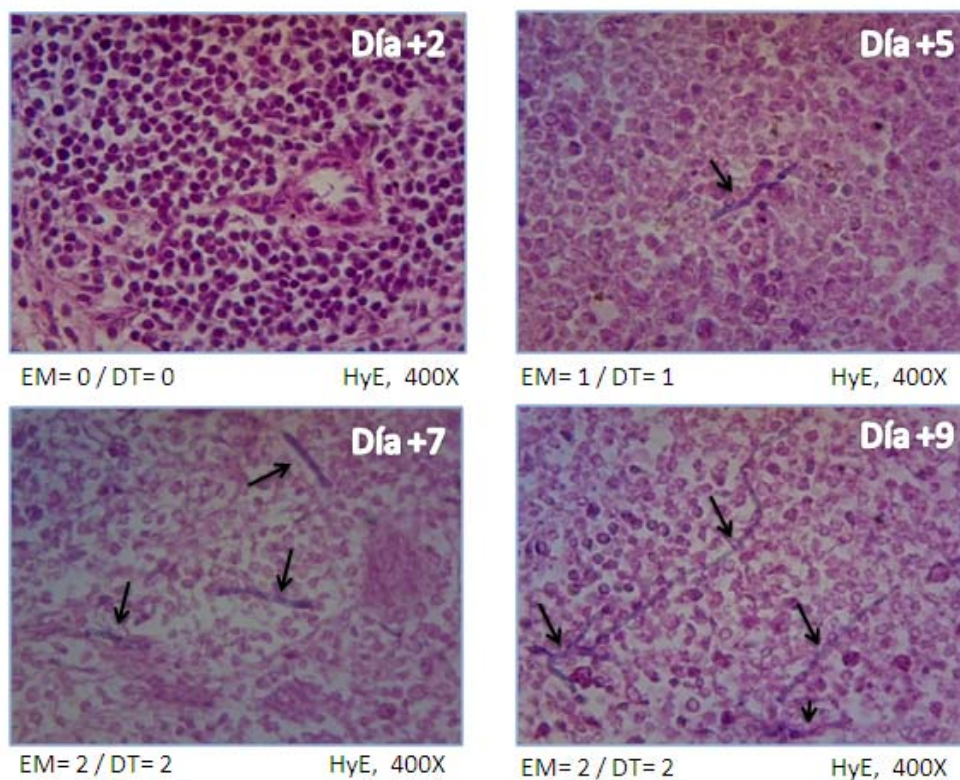


Tabla 3. Semicuantificación histológica de *F. solani* en bazo de ratones BALB/c.

Día post-infección	EM ^a	DT ^b
+2	0	0
+5	1	1
+7	2	2
+9	2	2

^a Estructuras micóticas

^b Daño tisular

3.2.4. Semicuantificación histológica de *F. solani* en riñón

En la figura 8 se muestran micrografías de cortes de riñón representativas de cada día experimental (días +2, +5, +7 y +9 post-infección) en las cuales se observa el progreso de la infección por *F. solani* en riñones de ratones BALB/c. En la tabla 4 se muestran los resultados de la semicuantificación del hongo en riñones de los ratones BALB/c infectados.

Figura 8. Micrografías de cortes de riñón de ratones BALB/c infectados con *F. solani*.

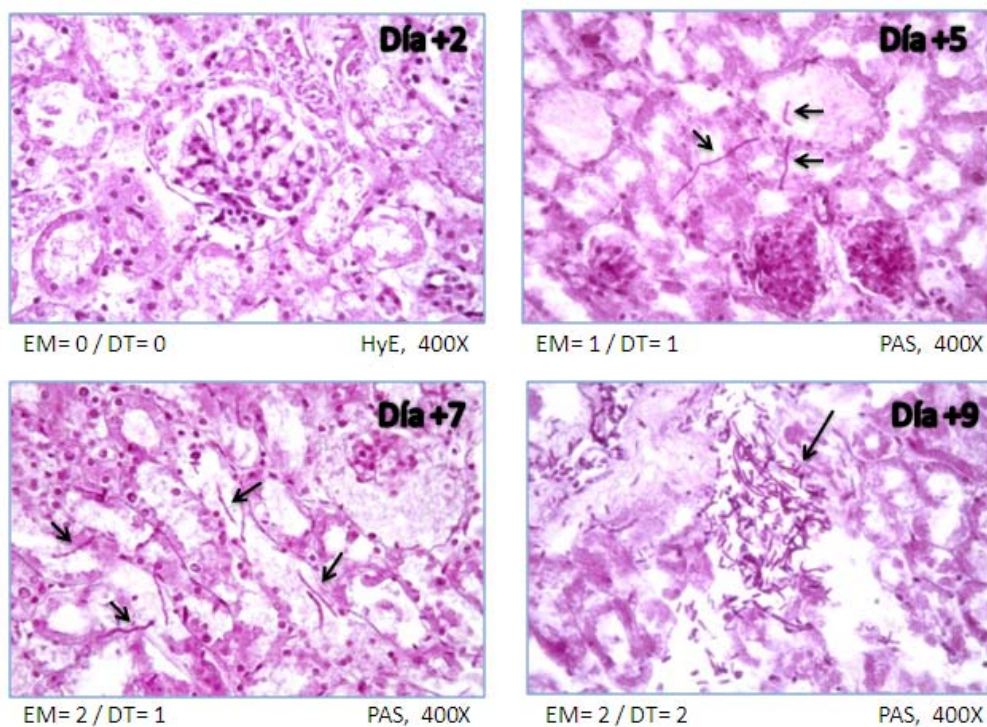


Tabla 4. Semicuantificación histológica de *F. solani* en riñones de ratones BALB/c.

Día post-infección	EM ^a	DT ^b
+2	0	0
+5	1	1
+7	2	1
+9	2	2

^a Estructuras micóticas

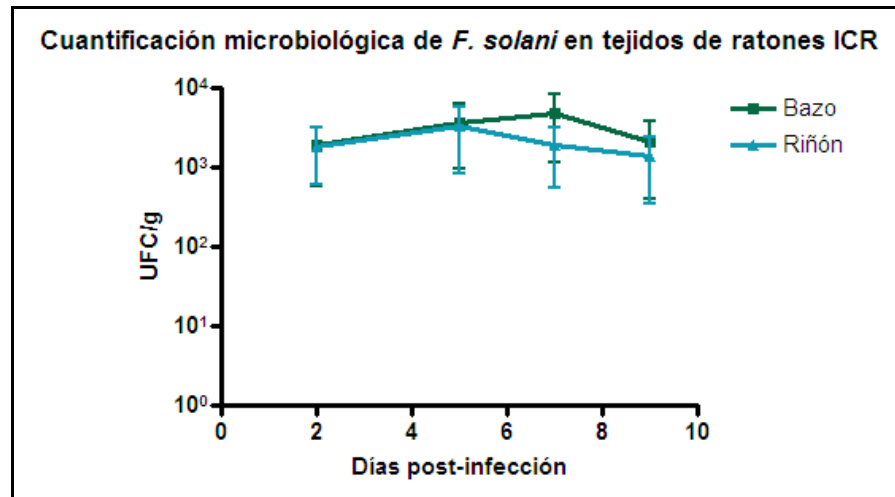
^b Daño tisular

3.3. Estudio de carga microbiana en ratones ICR

3.3.1. Cuantificación microbiológica de *F. solani*

En la figura 9 se muestran los resultados de la cuantificación del hongo en bazo y riñón de ratones ICR infectados, en ambos órganos la cantidad de *F. solani* se encuentra alrededor de 1×10^3 UFC/gramo de tejido durante los nueve días posteriores a la infección.

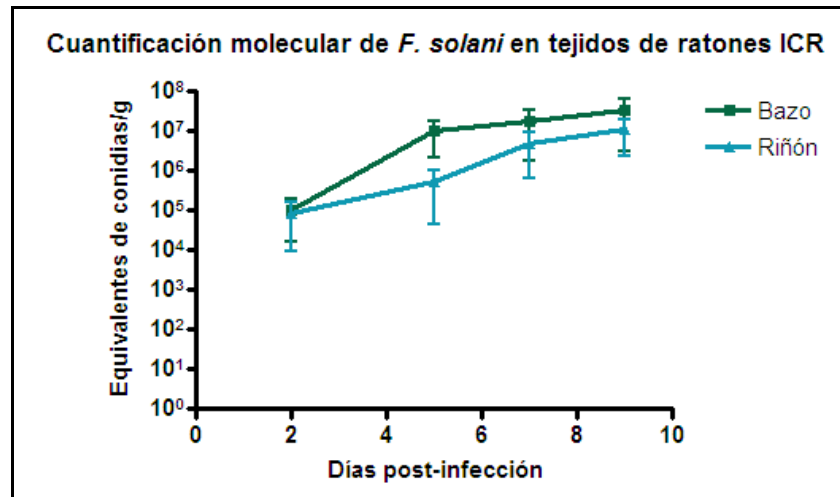
Figura 9. Cuantificación microbiológica de *F. solani* en tejidos de ratones ICR.



3.3.2. Cuantificación molecular de *F. solani*

En la figura 10 se muestran los resultados de la cuantificación del hongo en tejidos de ratones ICR por el método molecular, se observa que después de la infección intravenosa, la cantidad de hongo en ambos órganos va en incremento conforme pasan los días, la carga fúngica es similar en bazo y riñón, el día +2 post-infección se cuantificó cerca de 1×10^5 equivalentes de conidias/gramo de tejido y para el día +9 se alcanzó un máximo de aproximadamente 1×10^7 equivalentes de conidias de *F. solani*/gramo tanto de bazo como de riñón.

Figura 10. Cuantificación molecular de *F. solani* en tejidos de ratones ICR.



3.3.3. Semicuantificación histológica de *F. solani* en bazo

En la figura 11 se muestran micrografías de cortes de bazo representativas de cada día experimental (días +2, +5, +7 y +9 post-infección) en las cuales se observa el progreso de la infección por *F. solani* en bazo de ratones ICR. En la tabla 5 se muestran los resultados de la semicuantificación del hongo en bazo de los ratones ICR infectados.

Figura 11. Micrografías de cortes de bazo de ratones ICR infectados con *F. solani*.

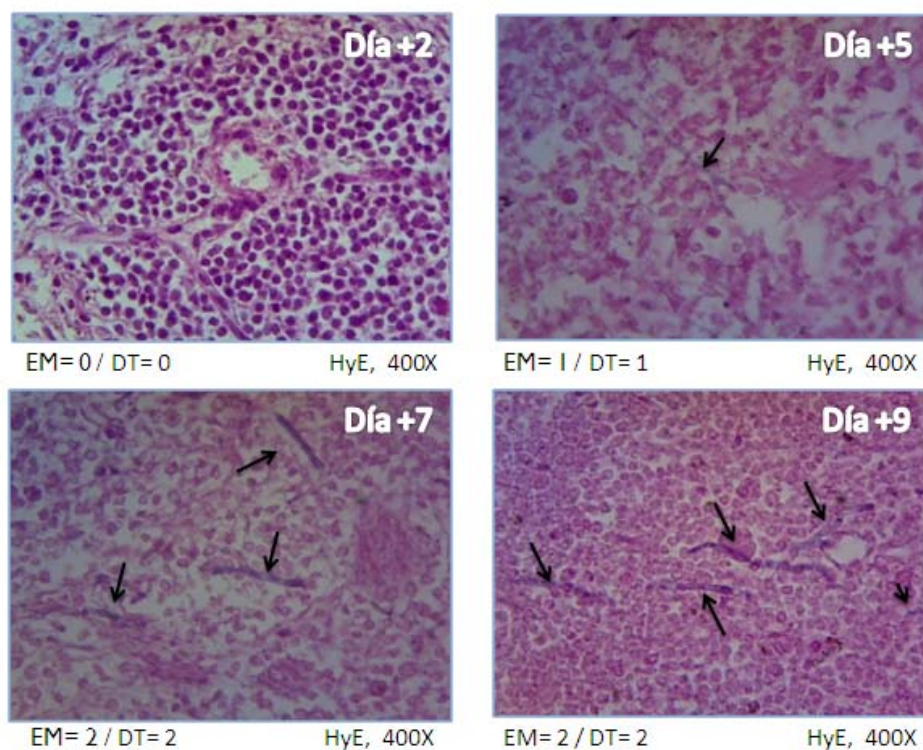


Tabla 5. Semicuantificación histológica de *F. solani* en bazo de ratones ICR.

Día post-infección	EM ^a	DT ^b
+2	0	0
+5	1	1
+7	2	2
+9	2	2

^a Estructuras micóticas

^b Daño tisular

3.3.4. Semicuantificación histológica de *F. solani* en riñón

En la figura 12 se muestran micrografías de cortes de riñón representativas de cada día experimental (días +2, +5, +7 y +9 post-infección) en las cuales se observa el progreso de la infección por *F. solani* en riñones de ratones ICR. En la tabla 6 se muestran los resultados de la semicuantificación del hongo en riñones de los ratones ICR infectados.

Figura 12. Micrografías de cortes de riñón de ratones ICR infectados con *F. solani*.

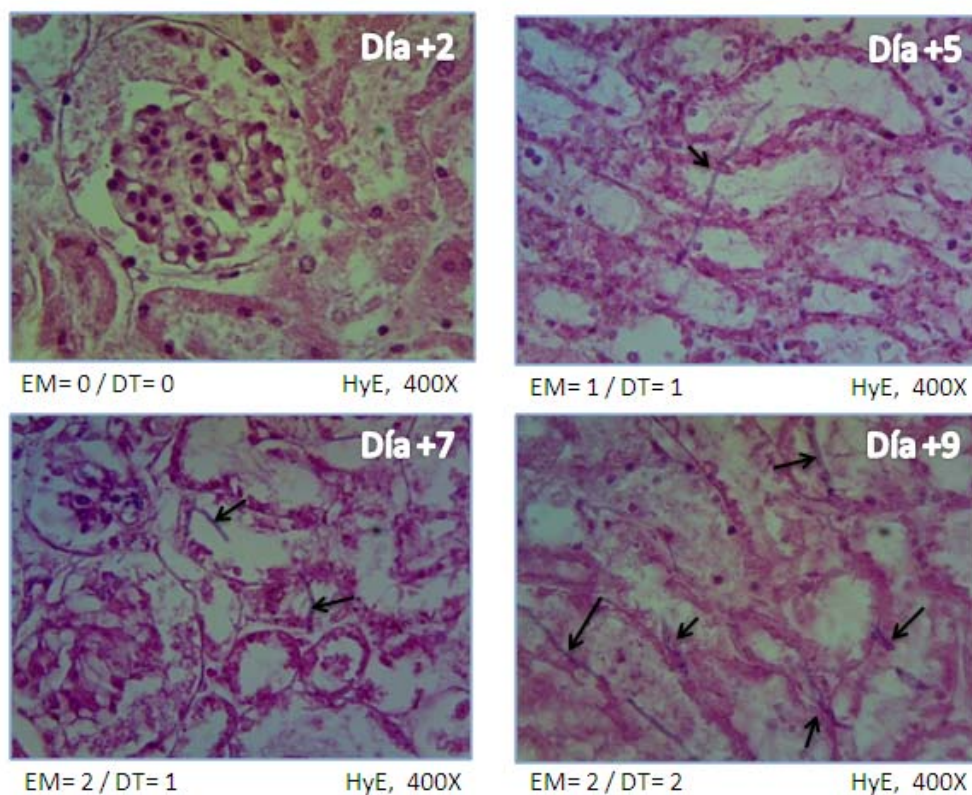


Tabla 6. Semicuantificación histológica de *F. solani* en riñones de ratones ICR.

Día post-infección	EM^a	DT^b
+2	0	0
+5	1	1
+7	2	1
+9	2	2

^a Estructuras micóticas

^b Daño tisular

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

Existen diversas publicaciones donde se reporta el uso de modelos murinos, principalmente para estudios de susceptibilidad *in vivo* [18-19, 21-23]. En el caso particular de *F. solani*, estos estudios utilizaron los modelos animales para probar drogas sin evaluar previamente el modelo como tal, esto es, cepa de ratones a utilizar, dosis del inóculo, esquema de inmunosupresión, sobrevivencia de los ratones infectados, entre otros aspectos. En 1991 Legrand et al [16] desarrollaron un modelo murino de fusariosis sistémica, en el cual probaron tres inóculos distintos de *F. solani* (5×10^5 , 1×10^6 y 5×10^6 conidias/ratón) y dos diferentes cepas del hongo en dos cepas exogámicas de ratones (CF₁ y CD₁) y realizaron estudios de sobrevivencia y de carga microbiana. En este trabajo realizamos en primera instancia un estudio de sobrevivencia, se utilizaron tres cepas de ratones endogámicos (BALB/c, C57BL y CB6F1) y una cepa exogámica (ICR) las cuales infectamos con 1×10^7 conidias de *F. solani*/ratón. Estudios previos en los cuales se infectaron un grupo de ratones BALB/c con 6×10^6 conidias/ratón, demostraron que con éste inóculo se obtuvo baja mortalidad. Por otro lado, al aumentar el inóculo a 1×10^7 conidias de *F. solani*/ratón y con el esquema de inmunosupresión utilizado (200mg de ciclofosfamida/Kg, una dosis el d-2 y una segunda dosis el día +1 relativos a la infección (d0)) se logró establecer una infección aguda en las cepas BALB/c e ICR (mortalidad del 100% los días +10 y +11 post-infección, respectivamente), no así en los ratones C57BL y

CB6F1 los cuales fueron resistentes a la infección (sobrevivencia del 70% y 90% el día +14 post-infección, respectivamente). El propósito del primer objetivo de este trabajo fue el de evaluar el establecimiento de la infección en estas cuatro cepas de ratones a fin de seleccionar aquella(s) donde se lograra establecer una infección aguda con una mortalidad del 100% de los ratones dentro de los días 10 a 14 post-infección de manera que pueda ser utilizado para realizar ensayos de eficacia terapéutica. Por ello, se seleccionaron las cepas BALB/c e ICR para continuar con la segunda parte del proyecto.

Los estudios de carga microbiana para la cuantificación de hongos filamentosos se han hecho de la misma forma en la que se cuantifica hongos levaduriformes, esto es, mediante el uso de las unidades formadoras de colonias por gramo de tejido infectado. Sin embargo, en 2001 Bowman et al. [17] proponen el uso de la cuantificación del ADN de hongos filamentosos, como *Aspergillus* spp., en tejidos infectados mediante el uso de PCR en tiempo real o qPCR, ya que como se sabe, una unidad formadora de colonia proviene de una célula en microorganismos unicelulares, pero en organismos filamentosos, es poco probable que esto se dé de esa forma. Para *F. solani* los estudios experimentales de eficacia terapéutica en ratones reportados hasta la fecha utilizan la cuantificación de UFC/g de tejido para sus ensayos de carga microbiana, en este estudio se diseñó un set de primers y sonda Taqman necesarios para establecer un método de cuantificación molecular por PCR en tiempo real para la cuantificación de *F. solani* en bazo y riñones de ratones infectados. Una vez estandarizado el método molecular, se procedió a realizar el estudio de carga microbiana en las cepas de ratones seleccionadas, para ello se infectaron

ratones BALB/c e ICR con 1×10^7 conidias de *F. solani*/ratón y posteriormente se cuantificó el hongo en cuatro días diferentes después de la infección por ambos métodos: mediante la cuantificación de UFC/gramo de tejido y la cuantificación del ADN fúngico. Además, se llevó a cabo la semicuantificación histológica. Lionakis et al [24] desarrollaron un modelo murino de fusariosis invasiva pulmonar donde utilizaron PCR en tiempo real para evaluar la eficacia de la pentamidina para el tratamiento de esta infección. Sin embargo, ellos utilizaron *F. oxysporum*, el cual es la segunda especie más común en infecciones en humanos después de *F. solani*.

Tal y como se esperaba no se observó variación en los resultados de la cuantificación microbiológica tanto en bazo como en riñones de los ratones BALB/c e ICR infectados, en ambas cepas se cuantificó alrededor de 1×10^3 UFC de *F. solani*/g de tejido los cuatro días de sacrificio de los animales (días +2, +5, +7 y +9 post-infección). Sin embargo, se obtuvieron valores muy diferentes cuando se llevó a cabo la cuantificación de ADN en los mismos tejidos de ambas cepas de ratones, con valores iniciales de 1×10^5 a 5×10^6 equivalentes de conidias/g de tejido el día +2 post-infección y valores máximos de 1×10^7 a 1×10^8 equivalentes de conidias/g de tejido el día +9 post-infección. En cuanto a la semicuantificación histológica, se logró observar la progresión de la infección, ya que la presencia de estructuras del hongo en ambos órganos fue en incremento del día +2 al día +9 después de la infección con *F. solani*, lo cual coincidió con los resultados obtenidos de la cuantificación molecular. La progresión de la infección en base a los resultados de la cuantificación molecular permite proponer ambas cepas de ratones, BALB/c e ICR, para

ser utilizadas en los ensayos futuros de eficacia terapéutica, ya que la progresión de la fusariosis en ambas cepas fue muy similar.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

1. Bajo las condiciones experimentales de concentración de inóculo y esquema de inmunosupresión establecidas en este modelo murino, las cepas BALB/c e ICR fueron susceptibles a la infección por *F. solani*, y las cepas C57BL y CB6F1 fueron resistentes.
2. Los resultados de la evaluación de la progresión de la infección fúngica mediante los procedimientos molecular y microbiológico fueron discrepantes.
3. La evaluación histológica coincidió con los resultados obtenidos de la cuantificación molecular.
4. La progresión de la infección fúngica en las cepas de ratones BALB/c e ICR fue muy similar, por lo que se podría utilizar cualquiera de las dos cepas para los estudios futuros de eficacia terapéutica.

CAPÍTULO 6

PERSPECTIVAS

El tratamiento de la fusariosis diseminada es complicado debido en parte a la respuesta refractaria que presentan los pacientes ante esta infección, además no se cuenta con estudios *in vivo* bien evaluados que permitan establecer regímenes terapéuticos eficaces para el tratamiento de la fusariosis.

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten establecer un modelo murino de fusariosis sistémica que puede ser utilizado para probar nuevos regímenes terapéuticos con antifúngicos existentes, combinaciones de los mismos o inclusive probar nuevos antifúngicos contra el género *Fusarium* específicamente *F. solani*. Además, este modelo podría ser utilizado en estudios de patogénesis o de respuesta inmune, tanto humoral como celular, que pudieran ayudar a tener un mejor entendimiento de la infección por este patógeno oportunista.

CAPÍTULO 7

REFERENCIAS

1. Nucci, M. and E. Anaissie, *Fusarium infections in immunocompromised patients*. Clin Microbiol Rev, 2007. **20**(4): p. 695-704.
2. Nelson, P.E., M.C. Dignani, and E.J. Anaissie, *Taxonomy, biology, and clinical aspects of Fusarium species*. Clin Microbiol Rev, 1994. **7**(4): p. 479-504.
3. Dignani, M.C. and E. Anaissie, *Human fusariosis*. Clin Microbiol Infect, 2004. **10 Suppl 1**: p. 67-75.
4. Bonifaz, A., *Micología Médica Básica*. Tercera ed. 2010, México: McGraw Hill. 540.
5. Nelson, P.E., T.A. Toussoun, and W.F.O. Marasas, *Fusarium species. An illustrated manual for identification*. 1983, Pennsylvania: The Pennsylvania State University Press. 193.
6. Guarro, J. and J. Gene, *Fusarium infections. Criteria for the identification of the responsible species*. Mycoses, 1992. **35**(5-6): p. 109-14.
7. G.S de Hoog, J.G., J. Gené and M.J. Figueras, *Atlas of clinical Fungi*. Second ed. 2000.
8. Lionakis, M.S. and D.P. Kontoyiannis, *Fusarium infections in critically ill patients*. Semin Respir Crit Care Med, 2004. **25**(2): p. 159-69.
9. Nucci, M., et al., *Fusarium infection in hematopoietic stem cell transplant recipients*. Clin Infect Dis, 2004. **38**(9): p. 1237-42.
10. Nucci, M. and E. Anaissie, *Emerging fungi*. Infect Dis Clin North Am, 2006. **20**(3): p. 563-79.
11. Nucci, M., et al., *Outcome predictors of 84 patients with hematologic malignancies and Fusarium infection*. Cancer, 2003. **98**(2): p. 315-9.
12. Nucci, M. and E. Anaissie, *Cutaneous infection by Fusarium species in healthy and immunocompromised hosts: implications for diagnosis and management*. Clin Infect Dis, 2002. **35**(8): p. 909-20.

13. Alastruey-Izquierdo, A., et al., *Antifungal susceptibility profile of clinical Fusarium spp. isolates identified by molecular methods*. J Antimicrob Chemother, 2008. **61**(4): p. 805-9.
14. Tortorano, A.M., et al., *Species distribution and in vitro antifungal susceptibility patterns of 75 clinical isolates of Fusarium spp. from northern Italy*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(7): p. 2683-5.
15. O'Donnell, K., et al., *Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the Fusarium solani species complex*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(8): p. 2477-90.
16. Legrand, C., et al., *Experimental fusarial hyalohyphomycosis in a murine model*. J Infect Dis, 1991. **164**(5): p. 944-8.
17. Bowman, J.C., et al., *Quantitative PCR assay to measure Aspergillus fumigatus burden in a murine model of disseminated aspergillosis: demonstration of efficacy of caspofungin acetate*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(12): p. 3474-81.
18. Guarro, J., I. Pujol, and E. Mayayo, *In vitro and in vivo experimental activities of antifungal agents against Fusarium solani*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(5): p. 1256-7.
19. Graybill, J.R., et al., *Improving the mouse model for studying the efficacy of voriconazole*. J Antimicrob Chemother, 2003. **51**(6): p. 1373-6.
20. Ruiz-Cendoya, M., et al., *Interactions between triazoles and amphotericin B in treatment of disseminated murine infection by Fusarium oxysporum*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(4): p. 1705-8.
21. Wiederhold, N.P., et al., *Efficacy of posaconazole as treatment and prophylaxis against Fusarium solani*. Antimicrob Agents Chemother, 2010. **54**(3): p. 1055-9.
22. Ortoneda, M., et al., *Efficacy of liposomal amphotericin B in treatment of systemic murine fusariosis*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(7): p. 2273-5.
23. Lozano-Chiu, M., et al., *Treatment of murine fusariosis with SCH 56592*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(3): p. 589-91.

24. Lionakis, M.S., et al., *Pentamidine is active in a neutropenic murine model of acute invasive pulmonary fusariosis*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(1): p. 294-7.
25. Morozumi, P.A., E. Brummer, and D.A. Stevens, *Strain differences in resistance to infection reversed by route of challenge: studies in blastomycosis*. Infect Immun, 1981. **34**(2): p. 623-5.
26. Kirkland, T.N. and J. Fierer, *Inbred mouse strains differ in resistance to lethal Coccidioides immitis infection*. Infect Immun, 1983. **40**(3): p. 912-6.
27. Morozumi, P.A., J.W. Halpern, and D.A. Stevens, *Susceptibility differences of inbred strains of mice to blastomycosis*. Infect Immun, 1981. **32**(1): p. 160-8.
28. Calderon, L., et al., *Genetic susceptibility to vaginal candidiasis*. Med Mycol, 2003. **41**(2): p. 143-7.
29. Doyle, J.J.a.J.L.D., *A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue*. Phytochemistry Bulletin, 1987. **19**: p. 11-15.
30. Cullings, K.W., *Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies*. Molecular Ecology, 1992. **1**: p. 233-240.
31. Jaeger, E.E., et al., *Rapid detection and identification of Candida, Aspergillus, and Fusarium species in ocular samples using nested PCR*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(8): p. 2902-8.
32. Dennis, C.G., et al., *Effect of amphotericin B and micafungin combination on survival, histopathology, and fungal burden in experimental aspergillosis in the p47phox^{-/-} mouse model of chronic granulomatous disease*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(2): p. 422-7.